

硫化氢通过下调葡萄糖调节蛋白 78 参与大鼠急性心肌缺血保护

郭雅琼 李宏宝 鲁彦 伏晓琳 陈红梅 郑天珍

摘要 **目的** 探讨硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)是否通过改变葡萄糖调节蛋白 78(glucose regulated protein 78, GRP78)的表达参与大鼠急性心肌缺血保护。**方法** 36 只雄性 SD 大鼠随机分为:正常对照组、心肌缺血 4、8、12、24h 组和 H_2S 组,每组 6 只。心肌缺血模型采用皮下多点注射 10mg/kg 的异丙肾上腺素(isoprenosine hydrochloride, ISO)。 H_2S 组于缺血 24h 后腹腔注射 5.6 $\mu\text{mol/kg}$ 的 H_2S 供体 NaHS,取材前 15min 再次给予等剂量 NaHS,余各组注射等剂量生理盐水。造模后检测血清学指标、心电图及病理组织学变化,确定心肌缺血模型是否建立成功;采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和实时荧光定量 PCR(real time-PCR)分别对各组心肌 GRP78 mRNA 的表达进行定性和相对定量分析。**结果** 与正常组比较,缺血模型组心肌组织中 GRP78 mRNA 的表达显著上调。与缺血 24h 组比较, H_2S 组 GRP78 mRNA 的表达显著下调。**结论** H_2S 保护心肌缺血的效应可能部分通过下调 GRP78 产生作用。

关键词 心肌缺血 硫化氢 内质网应激 大鼠

Protective Effects of Hydrogen Sulfide in Rats with Acute Myocardial Ischemia by Down-regulating of Glucose Regulated Protein 78 (GRP78). Guo Yaqiong, Li Hongbao, Lu Yan, Fu Xiaolin, Chen Hongmei, Zheng Tianzhen. Department of Physiology, Basic Medical College of Lanzhou University, Gansu 730000, China

Abstract Objective To investigate whether protective effects of hydrogen sulfide (H_2S) in the myocardial ischemia injury are mediated by alteration of the expression of GRP78 in rats. **Methods** Thirty-six SD rats were randomized into control group, myocardial ischemia group (4, 8, 12 and 24h) and H_2S administration group. Myocardial ischemia was induced by subcutaneous injection of isoprenosine hydrochloride through multisite and multipath way protocol. NaHS (5.6 $\mu\text{mol/kg}$), the donor of H_2S , was intraperitoneal injected after 24h of ischemia and 15min before drawing the materials. The electrocardiogram, myocardial enzymes and histological changes were detected to define the myocardial ischemia. The GRP78 mRNA expression was detected by RT-PCR and real time-PCR in myocardium. **Results** The expression of GRP78 was significantly increased in myocardial ischemia groups than that in control group. H_2S significantly decreased the expression of GRP78 mRNA in myocardial ischemia 24h group. **Conclusion** H_2S produces probably protective effects in myocardial ischemia injury which is partly mediated by decreasing of the expression of GRP78.

Key words Myocardial ischemia; Hydrogen sulfide; Endoplasmic reticulum stress; Rats

硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)以往一直被认为是一种无色、有臭鸡蛋气味的有毒气体。近年来研究表明, H_2S 是继一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)之后的第 3 种内源性气体信号分子,具有降低血压、抑制血管平滑肌生长和减轻血管重构等多种生物学效应^[1,2]。在大剂量 ISO 皮下注射诱导的急性心肌缺

血模型中的研究表明,内源性 H_2S 通过清除氧自由基、降低脂质过氧化物聚集和激活钾离子 ATP 通道(K_{ATP})等机制参与缺血心肌保护效应^[3-5]。研究表明心肌缺血作为一种应激刺激诱导机体发生内质网应激,导致内质网稳态被打乱,蛋白质无法正确折叠,而葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78kDa, GRP78)作为内质网应激的分子伴侣,具有协助蛋白质组装及转运,维持机体 Ca^{2+} 平衡、减轻内质网负担、保护内质网功能的作用,缺氧、缺血和内质网钙平衡紊乱等刺激均可诱导 GRP78 合成增加,其高表达能明显减轻内质网应激反应^[6,7]。 H_2S 具有保护心肌缺血损伤的作用,但 H_2S 是否通过影响缺血损伤心肌组织中 GRP78 表达参与对缺血心

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30700266);中央高校基本科研业务费专项资金(lzujbky-2010-146)

作者单位:730000 兰州大学基础医学院生理学(郭雅琼、李宏宝、陈红梅、郑天珍);730030 兰州,中国人民解放军第一医院检验科(鲁彦);730000 兰州大学第一医院急诊科(伏晓琳)

通讯作者:鲁彦、郑天珍,电子信箱:lu73free@yahoo.com.cn 或 zhengtz@lzu.edu.cn

肌损伤保护效应目前未见报道。因此,我们在 ISO 诱导的急性心肌缺血损伤模型中,通过给予 H_2S 供体 NaHS,观察 H_2S 对缺血心肌组织中 GRP78 表达的影响,探讨 GRP78 是否介导了 H_2S 的急性心肌缺血保护效应。

材料与方法

1. 实验动物:雄性 SD 大鼠 36 只,清洁级,体重 200 ~ 250g,购自兰州大学医学实验动物中心[实验动物许可证号:SCXR(甘)2005-0007]。36 只大鼠随机分为:①正常对照组($n=6$);②缺血 4h($n=6$);③缺血 8h 组($n=6$);④缺血 12h 组($n=6$);⑤缺血 24h 组($n=6$),参考文献[8]方法制备大鼠心肌缺血模型,即皮下多点注射 10mg/kg 的 ISO;⑥ H_2S 组($n=6$):缺血 24h 后腹腔注射 $5.6\mu\text{mol/kg}$ (0.14ml/g) 的 H_2S 供体 NaHS,取材前 15min 再次给予等剂量 NaHS,余各组注射等剂量生理盐水。正常对照组及缺血模型组注射生理盐水(0.14ml/g)。各组大鼠实验结束后测心电图,留血清、心脏标本^[5]。

2. 主要试剂:ISO 购自上海禾丰制药有限公司;NaHS 购自 Sigma 公司;RNAiso Plus 抽提试剂、反转录酶(AMV)、dNTP Mixture、随机引物、DNA Marker 及 Taq 聚合酶均购自 TaKaRa 公司;引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,序列如下:GRP78 - F:5' - TGACCTGGTTCTGCTTGATG - 3', GRP78 - R:5' - GATTGTTACGGTGGGCTGAT - 3', 扩增片段 146bp;GAPDH - F:5' - GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG - 3', GAPDH - R:5' - ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA - 3', 扩增片段 167bp。

3. 心电图检测:各组大鼠分别腹腔注射 40mg/kg 戊巴比妥钠麻醉,仰卧位固定,采用针型电极插入皮下的方法记录肢体导联心电图,利用生物信号记录系统(RM 6240, XJH - 2007)描记心电图。

4. 血清酶学指标检测:心电图记录后,经颈总动脉采血,分离血清,全自动生化分析仪(雅培 2000, 日本)检测谷草转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK - MB)和 α - 羟丁酸脱氢酶(α - HBDH)水平。

5. 心肌组织学观察:实验结束后,开胸暴露心脏,取材、固定、脱水、透明、石蜡包埋、切片,HE 染色,观察心肌组织学变化。

6. RT - PCR:取冻存标本匀浆后,按照 RNAiso Plus 试剂说明提取心肌组织总 RNA,以此为模板应用 Oligo(dT)¹⁸ 为引物,AMV 为反转录酶,将 RNA 反转录成 cDNA。PCR 反应体系(25 μ l):Taq 聚合酶 0.25 μ l, MgCl₂ 2.5 μ l, 10 × Buffer 2.5 μ l, dNTP mixture 4 μ l, 模板 DNA 1 μ l, 目的基因及 GAPDH 各自上下游引物 0.5 μ l, 加灭菌蒸馏水至 25 μ l。反应条件:94℃ 5min, 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 1min, 30 个循环。PCR 产物经 1.5% 琼脂凝胶电泳,凝胶成像系统扫描,进行定性分析。

7. Real time - PCR:①RNA 提取、反转录同 RT - PCR;②PCR:SYBR Premix Ex Taq 12.5 μ l, ROX Reference Dye II 0.5 μ l, 模板 DNA 1.0 μ l, GRP78 或 GAPDH 上下游引物各 0.5 μ l, 灭菌蒸馏水 10.0 μ l → 95℃ 2min, 95℃ 10s, 63℃ 20s, 72℃ 30s, 40 个循环;③GRP78 mRNA 相对定量分析:分析融解曲线、扩增曲线,确认 Ct 值(PCR 扩增过程中,扩增产物的荧光信号达到设定阈值时所经过的扩增循环次数)及 PCR 反应的特异性;采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}} = (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{GAPDH}})_{\text{实验组}} - (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{GAPDH}})_{\text{对照组}}$)计算 GRP78 相对表达量,将对照组样品表达量视作“1”,进行样品间相对表达量的比较。

8. 统计学方法:实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组数据间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD - t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 缺血不同时间大鼠心电图、血清学指标及组织学变化:与正常对照组相比,缺血大鼠 ST 段下移或压低, T 波倒置,并随缺血持续时间的延长, ST 段和 T 波的改变更加明显;而血清 AST、CK、CK - MB、LDH 和 α - HBDH 于缺血 4h 升高, CK、CK - MB 和 LDH 于缺血 4h 达高峰, AST、 α - HBDH 分别于缺血 12、24h 达高峰(图 1A ~ E、表 1)。

HE 染色显示,正常对照组大鼠心肌细胞排列整齐紧密,胞核饱满,间质无充血水肿;缺血 4h 组心肌出现变性,心肌细胞疏松、肥大;随着缺血时间延长,心肌变性面积明显增加,出现肌质凝固、间隙增宽、间质水肿,伴出血及少量淋巴细胞浸润,至缺血 24h,出现无结构的肌丝,并有大量炎性细胞浸润,形成凝固性肌溶解,并可见成纤维细胞增生(图 2A ~ E)。

2. H_2S 对缺血损伤大鼠心电图、血清学指标及病理改变的影响:与模型组比较,经 H_2S 治疗后,大鼠心电图虽然还有 ST 段下移或压低、T 波倒置现象,但不及模型组明显。血清 AST、CK、CK - MB、LDH 和 α - HBDH 均显著降低,与模型组比较有统计学意义(图 1A、图 1E、图 1F、表 1)。与模型组比较, H_2S 组大鼠心肌细胞排列尚整齐紧密,病变呈现局灶性变性、凝固,缺血组织病理变化显著改善(图 2A、E、F)。

3. 缺血不同时间心肌 GRP78 的表达:RT - PCR 结果显示,正常组和各缺血模型组心肌组织均有 GRP78 表达(图 3A)。Real time - PCR 定量分析结果进一步显示,与对照组比较,缺血 4、8、24h 组 GRP78 mRNA 表达均显著上调(图 3B)。

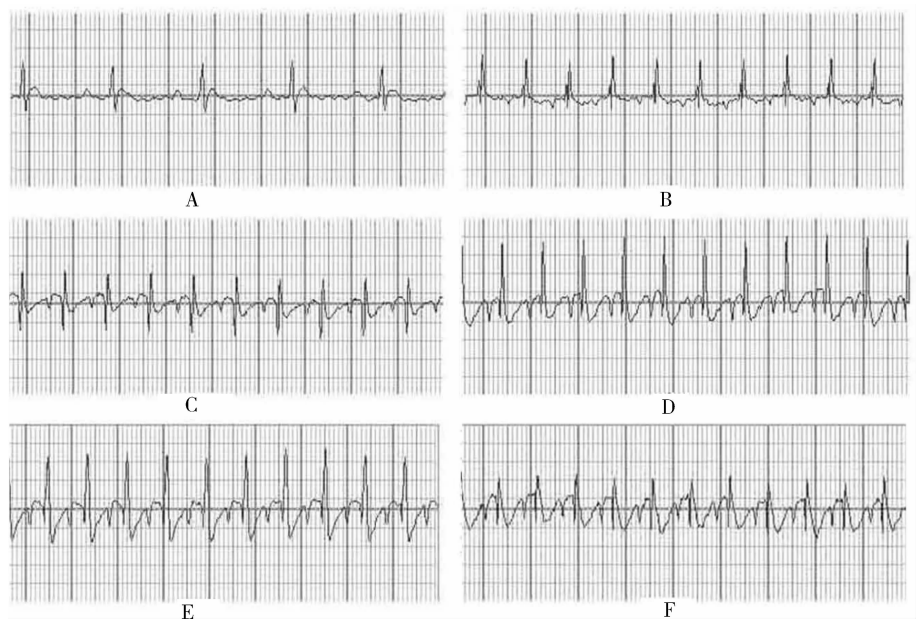


图 1 缺血后不同时间及 H₂S 治疗后大鼠心电图的变化
A. 正常对照组; B ~ E. 分别为缺血 4、8、12、24h 组; F. H₂S 组

表 1 各组大鼠的血清酶学指标 (U/L, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分组	AST	CK	CK - MB	LDH	α - HBDH
正常对照组	81.0 $\pm$ 13.6	513.3 $\pm$ 45.5	525.5 $\pm$ 135.9	232.5 $\pm$ 97.4	146.0 $\pm$ 63.9
缺血 4h 组	99.3 $\pm$ 12.6	951.3 $\pm$ 253.9 *	732.2 $\pm$ 168.3 *	564.8 $\pm$ 70.9 *	159.0 $\pm$ 44.8
缺血 8h 组	178.0 $\pm$ 52.6 *	602.0 $\pm$ 207.6	704.0 $\pm$ 114.8 *	326.2 $\pm$ 102.7	267.4 $\pm$ 40.7
缺血 12h 组	191.2 $\pm$ 25.5 *	565.6 $\pm$ 228.0	653.0 $\pm$ 51.0	469.0 $\pm$ 219.0 *	345.8 $\pm$ 36.3 *
缺血 24h 组	167.8 $\pm$ 59.1 *	596.3 $\pm$ 82.6	618.3 $\pm$ 44.6	307.0 $\pm$ 114.9	473.3 $\pm$ 69.3 *
H ₂ S 组	127.3 $\pm$ 13.1 **	484.8 $\pm$ 39.3	550.5 $\pm$ 62.8 #	266.8 $\pm$ 79.2 #	186.8 $\pm$ 18.2 #

与对照组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$; AST. 谷草转氨酶; CK. 肌酸激酶; CK - MB. 肌酸激酶同工酶; LDH. 乳酸脱氢酶; α - HBDH; α - 羟丁酸脱氢酶

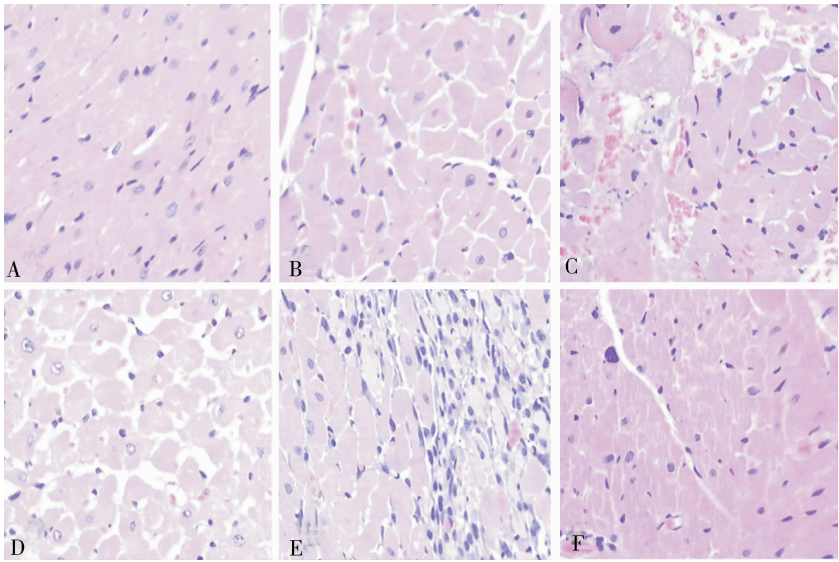


图 2 缺血不同时间及 H₂S 治疗后大鼠心肌组织病理学变化 (HE, $\times 200$)
A. 正常对照组; B ~ E. 依次为缺血 4、8、12、24h 组; F. H₂S 组

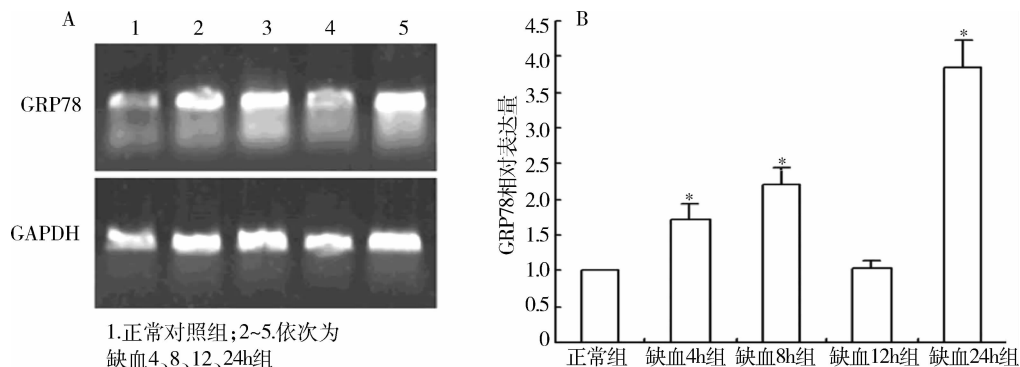


图3 缺血不同时间心肌 GRP78 的表达

与对照组比较, * $P < 0.01$

4. H_2S 对缺血损伤大鼠心肌 GRP78 表达的影响: RT-PCR 结果显示, 各组心肌均有 GRP78 表达 (图

4A)。Real time-PCR 结果显示, 与模型组比较, H_2S 治疗后 GRP78 mRNA 表达显著下调 (图 4B)。

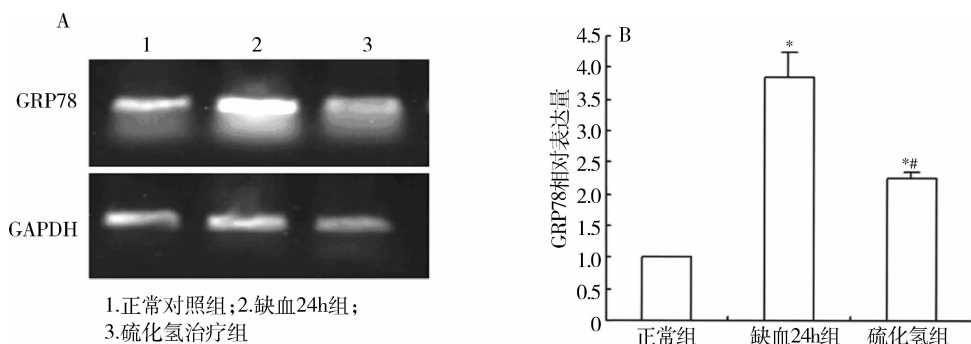


图4 H_2S 对心肌 GRP78 表达的影响

与对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.01$

讨 论

目前本实验研究表明: ① 心肌缺血能诱导 GRP78 表达增加; ② H_2S 可能部分通过下调 GRP78 产生心肌缺血保护效应。

大剂量 ISO 可诱导大鼠发生急性心肌缺血, 其病理变化类似于人类心肌急性缺血^[9]。本实验模型组大鼠经皮下多点注射 ISO 后, 心电图显示 ST 段较正常对照组明显降低, 酶学指标显示大鼠血清 ALT、AST、CK、CK-MB 和 α -HBDH 水平明显高于对照组, 此外, 结合心脏病理切片表现, 均说明急性心肌缺血模型成功。给予 H_2S 治疗后, 大鼠心电图 ST 段恢复逐渐复, 血清 ALT、AST、CK、CK-MB 和 α -HBDH 水平降低及心肌病变程度减轻, 均提示外源性 H_2S 可减轻 ISO 诱导的大鼠急性心肌缺血损伤, 对急性心肌缺血大鼠心脏有明显的保护作用。

H_2S 作为一种内源性气体信号分子, 具有舒张血管、抑制炎症反应及血管平滑肌生长、减轻血管重构等作用, 通过清除自由基、减少钙超载, 抑制脂多糖诱

导的 NO 生成, 激活丝氨酸-苏氨酸激酶、 K_{ATP} 及 MAPK 信号途径等发挥心肌保护作用^[10-13]。韩文章等^[14]通过对冠心病患者血浆 H_2S 浓度的实验研究发现内源性 H_2S 浓度可能与心肌缺血严重程度相关: 内源性 H_2S 浓度越高, 缺血程度越低, 反之则缺血程度越高。心肌缺血作为一种应激刺激能诱导机体发生内质网应激, 导致内质网稳态被打乱, 蛋白质无法正确折叠, 最后发生聚集。因此, 缺血早期 (< 4h) GRP78 迅速与多种信号分子 (REPK、ATF6、IRE1) 解离, 转而与未折叠蛋白结合, 从而消除应激反应, 恢复内质网稳态, 保护细胞生存; 随着缺血持续时间的延长, 应激刺激强度超过阈值, 导致内质网功能障碍, 使内质网稳态无法恢复, 未折叠蛋白无法重新正确折叠, GRP78 转而与多种信号分子结合, 导致细胞程序性凋亡^[15-17]。我们在实验中发现, 缺血 4h, 心肌 GRP78 表达即上调, 心肌受损轻微; 4h 以后, GRP78 表达随缺血时间延长而逐渐增加, 心肌持续受损并逐渐加重。可能是因为缺血 4h 内, 缺血诱发内质网应

激,GRP78 迅速解离与未折叠蛋白结合,代偿性消除内质网应激,恢复内质网稳态以保护细胞生存。缺血 4h 以后,内质网功能障碍,出现失代偿,GRP78 与多种信号分子结合导致细胞凋亡,心肌持续受损。因此,在缺血 24h 后腹腔注射 H_2S ,结果显示 H_2S 能显著下调 GRP78 mRNA,可能与 H_2S 拮抗心肌缺血诱发的内质网应激过程有关。上述结果表明, H_2S 可能部分通过下调 GRP78 对缺血损伤心肌产生保护作用。

参考文献

- 1 Wang, R. Two's company, three's a crowd: can H_2S be the third endogenous gaseous transmitter? [J]. *FASEB J*, 2002, 16 (13): 1792 - 1798
- 2 Tang, C, Li X, Du J. Hydrogen sulfide as a new endogenous gaseous transmitter in the cardiovascular system [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2006, 4 (1): 17 - 22
- 3 Du J, Hui Y, Cheung Y, *et al.* The possible role of hydrogen sulfide as a smooth muscle cell proliferation inhibitor in rat cultured cells [J]. *Heart Vessels*, 2004, 19 (2): 75 - 80
- 4 Cai WJ, Wang MJ, Moore PK, *et al.* The novel proangiogenic effect of hydrogen sulfide is dependent on Akt phosphorylation [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 76 (1): 29 - 40
- 5 Meng QH, Yang G, Yang W, *et al.* Protective effect of hydrogen sulfide on balloon injury - induced neointima hyperplasia in rat carotid arteries [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170 (4): 1406 - 1414
- 6 David R. Metabolism: Fight the fat, cure the (ER) stress [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12 (6): 345
- 7 Rao RV, Peel A, Logvinova A, *et al.* Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78 [J]. *FEBS Lett*, 2002, 514 (2 - 3): 122 - 128
- 8 Han HG, Wang ZW, Zhang NB, *et al.* Role of nitric oxide during early phase myocardial ischemic preconditioning in rats [J]. *Chin Med*

J (Engl), 2008, 121 (13): 1210 - 1214

- 9 Heather LC, Catchpole AF, Catchpole, *et al.* Isoprinisine induces in vivo functional and metabolic abnormalities: similar to those found in the infarcted rat heart [J]. *Physiology Pharmacol*, 2009, 60 (3): 31 - 39
- 10 Zanoardo RC, Brancalione V, Distrutti E, *et al.* Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte - mediated inflammation [J]. *FASEB J*, 2006, 20 (12): 2118 - 2120
- 11 Chen CQ, Xin H, Zhu YZ. Hydrogen sulfide: third gaseous transmitter, but with great pharmacological potential [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28 (11): 1709 - 1716
- 12 Johansen D, Ytrehus K, Baxter GF. Exogenous hydrogen sulfide (H_2S) protects against regional myocardial ischemia - reperfusion injury - Evidence for a role of K ATP channels [J]. *Basic Res Cardiol*, 2006, 101 (1): 53 - 60
- 13 Geng B, Yang J, Qi Y, *et al.* H_2S generated by heart in rat and its effects on cardiac function [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313 (2): 362 - 368
- 14 韩文章, 蔡尚郎. 冠心病患者血浆硫化氢含量变化 [J]. *实用医药杂志*, 2007, 24 (5): 513 - 516
- 15 Lee MJ, Kee KH, Suh CH, *et al.* Capsaicin - induced apoptosis is regulated by endoplasmic reticulum stress - and calpain - mediated mitochondrial cell death pathways [J]. *Toxicology*, 2009, 264 (3): 205 - 214
- 16 Minamino T, Komuro I, Kitakaze M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 2010, 107 (9): 1071 - 1082
- 17 Zhuang W, Li L, Jiang H, *et al.* Endogenous stress contributes to cardiac injury after heart transplantation in rats [J]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2010, 35 (5): 424 - 430

(收稿:2011 - 06 - 30)

(修回:2011 - 07 - 08)

(上接第 19 页)

- 9 Steiner T, Ringleb P, Hacke W. Treatment options for large hemispheric stroke [J]. *Neurology*, 2001, 57 (5 Suppl 2): S61 - 68
- 10 Bernard SA, Gray TW, Buist MD, *et al.* Treatment of comatose survivors of out - of - hospital cardiac arrest with induced hypothermia [J]. *N Engl J Med*, 2002, 346 (8): 557 - 563
- 11 Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest [J]. *N Engl J Med*, 2002, 346 (8): 549 - 556
- 12 Dohmen C, Bosche B, Graf R, *et al.* Identification and clinical impact of impaired cerebrovascular autoregulation in patients with malignant middle cerebral artery infarction [J]. *Stroke*, 2007, 38 (1): 56 - 61

- 13 张春梅. 亚低温对急性大面积脑梗死的临床疗效和应激激素变化的研究 [J]. *中国现代医生*, 2009, 47 (15): 15 - 16
- 14 周坤, 黄智武. 亚低温治疗大面积脑梗死 28 例的疗效观察 [J]. *广西医学*, 2010, 32 (11): 1377 - 1379
- 15 张月辉, 詹成, 林文. 亚低温疗法治疗大面积脑梗死患者的疗效观察 [J]. *实用全科医学*, 2008, 6 (3): 266 - 267
- 16 Karakitsos D, Karabinis A. Hypothermia therapy after traumatic brain injury in children [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359 (11): 1179 - 1180
- 17 毕敏, 王德生, 童媛君, 等. 急性脑梗死局部亚低温治疗的时间窗研究 [J]. *中华神经医学杂志*, 2011, 10 (2): 159 - 163

(收稿:2011 - 04 - 13)

(修回:2011 - 05 - 03)